

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISABELLE CRISTINE PANSOLIN

POTENCIAL DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS PARA O CONTROLE DE
FUNGOS CAUSADORES DA PODRIDÃO DE COLMO DO MILHO

(*Zea mays* L.)

CURITIBA

2020

ISABELLE CRISTINE PANSOLIN

POTENCIAL DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS PARA O CONTROLE DE
FUNGOS CAUSADORES DA PODRIDÃO DE COLMO DO MILHO

(*Zea mays* L.)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de mestre em genética.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lygia Vitória Galli Terasawa.

Co-orientadores: Prof^a. Dr^a. Daiani Cristina Savi e Prof. Dr. Douglas Adamoski Meira.

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná

Sistema de Bibliotecas

(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Pansolin, Isabelle Cristine

Potencial de bactérias endofíticas para o controle de fungos causadores da podridão de colmo do milho (*Zea mays* L.). / Isabelle Cristine Pansolin. – Curitiba, 2020.

53 p.: il.

Orientadora: Lygia Vitória Galli Terasawa

Coorientadores: Daiani Cristina Savi e Douglas Adamoski Meira

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Milho. 2. Fungos. 3. Pragas agrícolas - Controle biológico. I. Título. II. Galli-Terasawa, Lygia Vitória. III. Savi, Daiani Cristina, 1987-. IV. Meira, Douglas Adamoski. V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (22. ed.) 632.96


TERMO DE APROVAÇÃO

ISABELLE CRISTINE PANSOLIN

POTENCIAL DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS PARA O CONTROLE DE
FUNGOS CAUSADORES DA PODRIDÃO DE COLMO DO MILHO

(*Zea mays* L.)

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do título de mestre em genética, do Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof^a. Dr^a. Lygia Vitória Galli Terasawa

Orientadora – Departamento de Genética – UFPR



Dr^a. Mariangela Hungria

Embrapa soja – Londrina - Paraná



Dr^a. Angela Ikeda

Departamento de Ciências Florestais – UFPR

Curitiba, 30 de abril de 2020.

A Deus por mais uma etapa concluída.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná e aos professores do Departamento de Genética, pela oportunidade e valiosa contribuição em minha formação.

À Prof^a. Dr^a. Lygia Vitória Galli Terasawa pela acolhida, orientação, confiança e amizade.

À minha co-orientadora Daiani Cristina Savi, por todo o conhecimento transferido e atenção dedicada ao meu trabalho.

Ao meu co-orientador Douglas Adamoski Meira, que com seu infinito conhecimento, dedicação e conselhos, me fez criar um novo olhar sobre a ciência e meu posicionamento diante dela.

A todos com que convivi no LabGeM, pelo apoio técnico e incentivo recebidos.

Às minhas companheiras de laboratório, Daniela Romani Bonotto, Franciele de Lima e Gabriela Maia, pela incansável ajuda e por todos os momentos que nos tornaram mais do que colegas, amigas.

À minha família, por sempre me incentivarem e acreditarem em mim.

“Quando eu pensar que aprendi a viver,
terei aprendido a morrer. ”

Leonardo da Vinci

RESUMO

O milho é uma das culturas mais antigas do mundo e apresenta grande importância econômica no Brasil e no mundo, devido a seus diversos usos, especialmente na alimentação animal e humana. Dessa forma, torna-se imprescindível um controle eficiente e sustentável das patologias que acometem esse cultivo, como as podridões de colmo, que são causadas principalmente por fungos dos gêneros *Colletotrichum*, *Fusarium* e *Stenocarpella*. Nesse contexto, podem ser usados controladores biológicos, como bactérias endofíticas, que têm mostrado cada vez mais seu elevado potencial de beneficiar as plantas, via mecanismos como a antibiose e a indução de resistência sistêmica das plantas. O objetivo deste trabalho foi investigar nove isolados bacterianos quanto ao seu potencial para o biocontrole de fungos causadores de podridões de colmo em milho. Para isso foram conduzidos ensaios *in vitro* e *in vivo*, e analisados genes relacionados a mecanismos de biocontrole, da via biossintética NRPS (*Nonribosomal Peptide Synthetase*), que sintetiza compostos com ação antifúngica, como fengicinas e surfactinas. O experimento de cultura pareada realizado *in vitro* apresentou resultados satisfatórios, com porcentagens de inibição do crescimento micelial fúngico superior a 70%. Quatro cepas apresentaram melhores resultados no experimento *in vitro* (LGMB141, LGMB143, LGMB152 e LGMB242) e foram identificadas por meio de análise multilocus dos genes 16S rRNA, *gyrA*, *recA* e *rpoB*, como pertencentes à espécie *Bacillus velezensis*. Essas cepas tiveram amplificação positiva para os genes da via NRPS. Assim, conclui-se que cepas de *Bacillus velezensis* são promissoras para uso agrícola no controle de fitopatógenos, sendo necessários estudos que esclareçam sua eficiência de uso em condições de campo.

Palavras-chave: Biocontrole; *Bacillus velezensis*; Podridões de Colmo de Milho.

ABSTRACT

Maize is one of the oldest crops in the world and it has great economic importance in Brazil and worldwide due to its various uses, especially in animal and human feeding. Thus, it is essential to control efficiently and sustainably the pathologies that affect this crop, such as stalk rot, which are mainly caused by fungi of the genera *Colletotrichum*, *Fusarium* and *Stenocarpella*. In this context, biological controllers can be used, such as endophytic bacteria, which have increasingly shown their high potential to benefit plants due to their various modes of action, such as antibiosis and induction of systemic resistance in plants. The objective of this work was to investigate nine bacterial isolates regarding their potential for the biocontrol of fungi causing stem rot in maize. For this, *in vitro* and *in vivo* assays were conducted, and genes related to biocontrol mechanisms of the biosynthetic pathway NRPS (*Nonribosomal Peptide Synthetase*) were analyzed, which synthesizes compounds with antifungal action, such as fengicins and surfactins. The paired culture experiment performed *in vitro* showed satisfactory results, with percentages of inhibition of fungal mycelial growth greater than 70%. Four strains showed the best results in the *in vitro* experiment (LGMB141, LGMB143, LGMB152 and LGMB242) and were identified by multilocus analysis of the genes 16S rRNA, *gyrA*, *recA* and *rpoB*, as belonging to the species *Bacillus velezensis*. These strains had positive amplification for the NRPS pathway genes. Thus, it is concluded that *Bacillus velezensis* strains are promising for agricultural use in the control of phytopathogens, requiring studies that clarify their efficiency of use under field conditions.

Keywords: Biocontrol; *Bacillus velezensis*; Maize Stalk rot.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Bayesian inference tree based on the 16S rRNA gene	32
FIGURA 2 - Bayesian inference tree based on the MLSA	33
FIGURA 3 - Fungal mycelial growth in the presence of bacterial	34
FIGURA 4 - Identification of genes related to biocontrol	36
FIGURA 5 - Agarose gel of the PCR products from using <i>Bvel-F</i> and <i>Bvel-R</i> primers.....	36

LISTA DE SIGLAS

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EUA – Estados Unidos da América

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

LB – Luria Bertani

MLSA – Multilocus Sequence Analysis

NA – Nutrient Agar

NRPS – Nonribosomal Peptide Synthetase

PCR – Polymerase Chain Reaction

PDA – Potato Dextrose Agar

RSA – Resistência Sistêmica Adquirida

RSI – Resistência Sistêmica Induzida

USDA – United States Department of Agriculture

YM – Yeast Malt

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 MILHO	15
2.1.1 Doenças fitopatogênicas como limitantes de produtividade do milho e seus impactos	16
2.2 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E O BIOCONTROLE	17
2.2.1 Mecanismos de biocontrole	20
2.3 IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS	21
2.3.1 Análises filogenéticas	23
3 OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 ARTIGO	26
4.1 ABSTRACT	26
4.2 INTRODUCTION	26
4.3 MATERIAL AND METHODS	28
4.3.1 Biological material	28
4.3.2 Bacterial identification	29
4.3.3 Biocontrol of phytopathogenic fungi <i>in vitro</i>	31
4.3.4 Proposal of biocontrol mechanisms	31
4.3.5 <i>In vivo</i> biocontrol assay	33
4.4 RESULTS	34
4.4.1 Bacterial identification	34
4.4.2 Biocontrol of phytopathogenic fungi <i>in vitro</i>	36
4.4.3 Proposal of biocontrol mechanisms	38
4.4.4 <i>In vivo</i> biocontrol assay	38
4.5 DISCUSSION	40
5 REFERENCES	42
6 SUPPLEMENTARY MATERIAL	51

1 INTRODUÇÃO

Há uma necessidade global de atender à crescente demanda alimentar da população humana (Alexandratos et al. 2012; Chakraborty e Newton 2011). Atualmente, a produção de milho é protegida contra fitopatógenos e de condições climáticas adversas por pesticidas químicos e pela seleção de genótipos vegetais resistentes (Boyd et al., 2013; Carvalho, 2017). No entanto, ambas as estratégias têm limitações. Os pesticidas não são eficazes contra todas as doenças e podem representar um risco para a saúde e para o meio ambiente, com resíduos tóxicos que podem se acumular no solo e posteriormente passar para os alimentos (Cheng et al. 2019 e Pal, 2006), e as plantas resistentes selecionadas via melhoramento genético, podem ter essa resistência superada por patógenos mutantes em poucos anos, com a necessidade contínua da criação de novos cultivares resistentes a fitopatógenos (McHughen e Wager, 2010). Portanto, a aplicação de microrganismos que possam atuar no biocontrole de fitopatógenos emerge como uma alternativa ambientalmente sustentável (Berg, 2009; Saravanakumar et al., 2017; Wang et al., 2020). Além disso, o desenvolvimento de novas ferramentas para uma agricultura sustentável se encaixa perfeitamente com as preocupações públicas constantemente dirigidas a alimentos seguros, de alta qualidade e sem pesticidas (Sarrocco e Vannacci, 2018).

O milho é uma das culturas que podem se beneficiar do uso do biocontrole. Atualmente, essa cultura é de grande importância mundial devido aos seus diversos usos, principalmente na alimentação animal, mas também na alimentação humana e como matéria-prima para diversas indústrias (Nuss e Tanumihardjo, 2010; Ranum, Peña-Rosas e Garcia-Casal, 2014). Entre as causas que podem ser atribuídas à diminuição da produção de milho, as perdas causadas por patógenos vegetais e pragas agrícolas desempenham um papel crucial, uma vez que são responsáveis por perdas estimadas em 22,5% da produção global desta safra. Desse percentual 6,5% ocorre devido a podridões do colmo de milho (Savary et al., 2019), que no Brasil, são causados principalmente pelos fungos *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Colletotrichum graminicola* e *Stenocarpella* sp. (Nesi, 2016).

Uma das alternativas para o tratamento de doenças vegetais é o uso de microrganismos para biocontrole (Li et al., 2018). Cepas de bactérias são investigadas para esse fim e espécies do gênero *Bacillus* são altamente promissoras (Torres et al., 2017). *Bacillus velezensis* foi relatado como inibidor do crescimento de muitos fungos patogênicos, tais como *Cryphonectria parasitica*, *Helicobasidium purpureum*, *Cylindrocladium quinqueseptatum*, *Aspergillus flavus* (Xu, Zhu e Li, 2016), *Cylindrocladium quinqueseptatum* (Xu, Zhu e Li, 2016), *Ralstonia solanacearum*, *Fusarium oxysporum* (Cao et al., 2018) e *Rhizoctonia solani* (Chowdhury et al., 2013). Esse biocontrole pode estar relacionado à biossíntese de lipopeptídeos (surfactina, iturina e fengicina, por exemplo), que são sintetizados independentemente de máquinas ribossômicas, em grandes complexos enzimáticos chamados de sintetase de peptídeos não ribossômicos (NRPS) (Martínez-Núñez e López, 2016).

Outro desafio além de encontrar microrganismos promissores para uso agrícola, é criar formas que facilitem o uso desses produtos pelo agricultor (Bashan et al., 2014). Os produtos líquidos convencionalmente utilizados têm algumas desvantagens como a vida útil limitada, condições de resfriamento necessárias para armazenamento a longo prazo e custos elevados, fatos que limitam seu uso em alguns casos (Stephens e Rask, 2000). Uma das possibilidades para substituir os produtos líquidos são as cápsulas de alginato, uma vez que a preparação dessas estruturas contendo bactérias é bastante simples e essas formulações são não tóxicas, biodegradáveis e os microrganismos são lentamente liberados para o solo, aumentando a eficiência de microrganismos inoculados (Bashan et al., 2002).

Portanto, como há poucos estudos direcionados ao uso de *B. velezensis* em podridões de colmo de milho e também não há relatos de diferentes formas de uso dessa bactéria no campo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de uma cepa de *B. velezensis* isolada das raízes do milho buscando respostas para perguntas sobre seu modo de ação e sua viabilidade para uso como biocontroladora na cultura do milho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MILHO

O milho é uma das culturas mais antigas do mundo e desde que seu processo de domesticação iniciou na Mesoamérica esse grão tem sido parte integrante da dieta de muitos povos (SERNA-SALDIVAR E CARRILLO, 2018). Cerca de 15% da produção mundial é consumida diretamente por seres humanos (FAO, 2019). No Brasil, esse valor é de aproximadamente 3%, sendo consumido principalmente sob a forma de seus derivados: fubá, farinha, óleo e amido. Em nível nacional, os grandes setores consumidores desse cultivo são a produção de alimento animal, que utiliza cerca de 59% do que é produzido e como matéria prima para fins industriais, ficando esse setor com 7,5% da produção. Outro destino importante do que é produzido são as exportações que representam 28% do uso deste cereal no país (CONAB, 2016).

No Brasil, em relação ao cultivo total de grãos, o milho representa uma média de 40% da produção em toneladas e 28% da área plantada do país (CONAB, 2016). Os estados do Mato Grosso e do Paraná são os maiores produtores, de modo que no Mato Grosso a produção da safra 2018/2019 chegou a 31,3 toneladas e no Paraná esse valor foi de 16,7 toneladas. A justificativa da diferença de quase o dobro do estado do Mato Grosso em relação ao Paraná está na área plantada, visto que a produtividade média em ambos é de 6,3 ton/ha (CONAB, 2019).

Entre as safras de 2007 a 2017 o Brasil foi responsável, em média, por 8% da produção mundial de milho (CONAB, 2018). Na safra 2018/2019 a produção mundial chegou a 1,12 bilhão de toneladas, estando o Brasil na terceira colocação do *ranking* com 101 milhões de toneladas, atrás dos Estados Unidos e China (USDA, 2019). Estes dois países apresentam valores superiores de produtividade em relação ao Brasil e de acordo com a CONAB (2019) a produtividade brasileira na última safra atingiu 5,7 ton/ha, enquanto que nos EUA esse valor chegou a aproximadamente 11 ton/ha (USDA, 2019).

Tendo em vista que o Brasil apresenta potencial para uma maior produção desse grão devido ao clima do país (CONAB, 2018), dois são os motivos apontados para a baixa produtividade observada: a baixa aplicação de tecnologias pelas pequenas propriedades e os entraves governamentais que dificultam a produção pela falta de ações como a disponibilização de crédito, política de preço mínimo, infraestrutura de armazenamento e logística de transporte (FANCELLI, ALVES E ALMEIDA, 2015). Nesse sentido, será cada vez mais importante concentrar esforços para balancear os investimentos em tecnologia com as necessidades do produtor e do consumidor, buscando o melhor desempenho do cultivo de milho no Brasil (CONAB, 2016).

2.1.1 Doenças fitopatogênicas como limitantes de produtividade do milho e seus impactos

Uma vez que a produtividade do milho no Brasil representa metade da produtividade nos Estados Unidos (CONAB, 2019; USDA, 2019) é importante direcionarmos esforços para otimizar o desenvolvimento dessa cultura no país, pois o setor ainda precisa solucionar obstáculos que impedem a máxima eficiência das lavouras (CONTINI et al., 2019).

Entre as causas que podem ser atribuídas à diminuição da produção de milho, as perdas causadas por patógenos vegetais e pragas agrícolas representam uma parcela considerável, visto que são responsáveis por perdas estimadas em 22,5% da produção global desta cultura, sendo cerca de 6,5% desse valor relativos às podridões de colmo do milho (SAVARY et al., 2019), que no Brasil, de acordo com Nesi (2016) são causadas principalmente por doenças como a antracnose (*Colletotrichum graminicola*), fusariose (*Fusarium verticillioides*), giberela (*Fusarium graminearum*) e diplodia (*Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora*). Todos os anos essas doenças causam perda de rendimento das lavouras em cerca de 5%, sendo que sob algumas condições as perdas podem exceder 10 a 20%. Isso acontece porque plantas com caules prematuramente apodrecidos produzem espigas leves e pouco preenchidas, devido ao acesso limitado a carboidratos durante o preenchimento de grãos. Além disso, colmos infectados são

convertidos a colmos ocos, ocasionando o tombamento da planta (JACKSON et al., 2009).

O manejo destas doenças é um desafio, pois não são controladas diretamente pelo uso de fungicidas foliares. Assim, além de práticas como o uso de cultivares geneticamente resistentes e rotação de culturas que já vêm sendo utilizadas como formas de controle, outras estratégias que possam auxiliar no manejo desses patógenos são fundamentais para a redução das perdas causadas por esse grupo de doenças (CONTINI et al. 2019).

2.2 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E O BIOCONTROLE

Desde que o termo endofítico surgiu em 1809 (LINK, 1809 apud HARDOIM et al. 2015) muitas definições têm sido formuladas para caracterizar esses microrganismos e a maioria delas se referem a microrganismos que invadem tecidos de plantas sem causar doenças (STONE et al. 2000). Embora esta definição venha sendo a base de muitos estudos, surgem algumas questões. Primeiro, essa definição só consegue ser testada com endófitos que se desenvolvem em condições de laboratório, ou seja, provavelmente existam microrganismos que colonizam as plantas e ainda não foram isolados e testados sobre sua patogenicidade (HARDOIM et al. 2015). Além disso, os testes de patogenicidade são normalmente realizados com apenas uma ou poucas espécies vegetais, embora a patogenicidade possa ocorrer em um vegetal diferente, ou sob condições diferentes (KLOEPPER et al. 2013). Dessa forma, existem pesquisadores que afirmam que o termo endófito deve se referir apenas ao hábitat e não à função do microrganismo e, portanto, que o termo deve ser geral e incluir todos os microrganismos que, ao menos em parte de sua vida colonizam tecidos vegetais internos (KUMAR et al., 2019).

Além dos microrganismos endofíticos existem os microrganismos que colonizam o entorno das plantas, em regiões denominadas de rizosfera (próximas da raiz) e filosfera (demais tecidos da planta) (OROZCO-MOSQUEDA et al. 2018). Estudos têm investigado a colonização de tecidos vegetais internos por endófitos, como o de Santoyo et al. (2016) que mostrou

dados disponíveis sobre vários pontos de entrada desses microrganismos, sendo a rizosfera uma importante região, explicada por sua natureza rica em nutrientes fornecidos pelos exsudatos radiculares. Há, ainda, outras áreas de entrada, como lenticelas, estômatos, feridas, rupturas e nódulos, além da herança de endófitos por transmissão vertical, através de sementes (FRANK et al., 2017).

O uso de microrganismo endofíticos com potencial para o controle biológico de patógenos aparece como uma excelente opção para o desenvolvimento de abordagens de manejo de baixo custo e sustentáveis para proteger cultivos vegetais (AZCÓN-AGUILAR E BAREA, 1997). A Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, define um produto da categoria Agrotóxicos como:

[...] produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos.

Desse modo, enquadram-se nessa categoria os agentes biológicos de controle (parasitoides, predadores e nematoides), os agentes microbiológicos de controle (fungos, bactérias e vírus), os semioquímicos, bioquímicos, extratos vegetais e minerais, utilizados na agricultura com a finalidade de controlar organismos considerados nocivos.

De acordo com Bettiol et al., 2012 no mercado mundial estão disponíveis mais de 40 espécies de antagonistas utilizados para o controle de doenças de plantas e os principais gêneros utilizados são *Trichoderma*, responsável por quase metade (43%) dos antagonistas comercializados, seguido de *Bacillus* (15%), *Paecilomyces* (8%) e *Pseudomonas* (6%). Em geral, esses produtos são recomendados para o controle de *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Botrytis cinerea* e *Moniliophthora perniciosa*, em culturas como feijão, soja, algodão, fumo, morango, tomate, cebola, alho, flores, plantas ornamentais e cacaueteiro.

Contudo, não existe comercialmente disponível nenhum inoculante com capacidade de controle sobre fungos que acometem a cultura do milho, e estudos buscam microrganismos promissores para esse fim. Cheng et al. (2018) testaram uma cepa de *Bacillus methylophilus* e constataram um controle de cerca de 80% das podridões causadas por *Fusarium graminearum* em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Do mesmo modo, Parikh et al. (2018) usaram cepas de *Burkholderia*, *Bacillus* e *Trichoderma* e obtiveram controle de até 60% de *Fusarium graminearum*. Para o fungo *Fusarium verticillioides* também já existem resultados promissores de controle, como nos estudos de Figueroa-López et al. (2016) e Cavaglieri et al. (2005) que obtiveram porcentagens de controle deste fungo em 45% e 60%, respectivamente. Ainda para o complexo de podridão de colmo, Bressan e Figueiredo (2005) utilizaram dois isolados identificados como *Streptomyces* sp. e obtiveram controle de mais de 85% de *Stenocarpella maydis* em ensaio em casa de vegetação.

De acordo com Bashan et al. (2014) além de encontrar microrganismos promissores para o uso agrícola, é igualmente importante criar maneiras que viabilizem o uso desses produtos pelo agricultor. Para isso, uma das possibilidades são as cápsulas de alginato de sódio, um polissacarídeo que ocorre naturalmente na parede celular de algas marinhas marrons (*Phaeophyceae*) agindo como componente estrutural na parede celular e nos espaços intracelulares, promovendo rigidez e, ao mesmo tempo, flexibilidade a estes organismos (GARCIA-CRUZ E FOGGETTI, 2008). Esse polissacarídeo possui propriedades interessantes para uso biotecnológico como a formação de uma matriz relativamente inerte, processo de encapsulação possível a temperatura ambiente e alta porosidade, que permitem a fácil liberação da substância encapsulada (SEZER E AKBUĞA, 1999). As formulações de alginato apresentam, ainda, outras vantagens, como sua natureza não tóxica, biodegradabilidade, disponibilidade a custos razoáveis e lentidão de liberação dos microrganismos para o solo, que é controlada pela estrutura polimérica (BASHAN et al. 2002).

Diversos artigos foram publicados nos últimos cinco anos utilizando-se as palavras-chave "inoculante" ou "biofertilizante" seguido por "produção" ou "desenvolvimento". Portanto, espera-se que, nos próximos anos, inovações

nesse campo cheguem ao mercado, abrangendo tanto microrganismos, quanto tecnologias que possam beneficiar o desenvolvimento agrícola (SANTOS et al. 2019).

2.2.1 Mecanismos de biocontrole

O antagonismo exercido por microrganismos contra fitopatógenos pode acontecer de maneira direta ou indireta. Mecanismos como competição, parasitismo e antibiose são exemplos de mecanismos diretos de antagonismo (FRANCESCO et al. 2016). A competição é a consequência da exigência do mesmo espaço ou nutrientes por dois ou mais microrganismos (NUNES, 2012), e o parasitismo ocorre quando um microrganismo se nutre das estruturas do outro (SPADARO e GULLINO, 2004). Por fim, a antibiose ocorre pela produção de metabólitos secundários que são compostos quimicamente complexos e não são essenciais ao crescimento, mas que podem ser requeridos em situações de estresse, tornando-se um fator chave na supressão de fitopatógenos (BARRIOS-GONZÁLEZ et al. 2003).

Dentro da classe de metabólitos secundários têm-se os peptídeos não ribossômicos que apresentam propriedades diversas como: toxinas, sideróforos, pigmentos, antibióticos, entre outros (RAAIJMAKERS et al., 2010). Ao contrário de outras proteínas, a biossíntese de metabólitos secundários é independente de maquinarias ribossômicas, de modo que são sintetizados em grandes complexos enzimáticos chamados de *Nonribosomal peptide synthetase* (NRPS) (MARTÍNEZ-NÚÑEZ E LÓPEZ, 2016).

Essas enzimas são divididas em módulos e cada módulo, por sua vez, possui ao menos três principais domínios. O domínio de adenilação (A) é responsável pelo reconhecimento e seleção dos aminoácidos que compõem o produto final, outro domínio chamado de proteína carreadora de peptidil (PCP), representa a unidade de transporte entre o aminoácido ativado e o seu cofator, e por fim, o domínio de condensação (C), é a entidade central da síntese de peptídeos não ribossômicos, pois é responsável pela formação de vínculos peptídicos entre os aminoácidos e as PCPs de módulos adjacentes (FINKING e MARAHIEL, 2004). Além dos domínios essenciais, uma série de outras enzimas atuam na maturação dos produtos formados como, por exemplo, a

enzima tioesterase (TE) que catalisa o final da síntese por hidrólise ou ciclização interna em bactérias (MARTÍNEZ-NÚÑEZ e LÓPEZ, 2016) .

A produção de peptídeos por bactérias *in vitro* está relacionada com a atividade antimicrobiana contra fitopatógenos (DUNLAP et al. 2013) e uma alternativa para facilitar a busca por grupamentos de genes que codificam um produto dessa natureza envolve a triagem dos módulos enzimáticos, utilizando experimentos de PCR (*polymerase chain reaction*) (O'HAGAN, 1992). Como existem regiões altamente conservadas nos domínios de adenilação desses complexos enzimáticos é possível desenhar *primers* que amplificam as regiões genômicas correspondentes, sendo possível inferir se um determinado organismo apresenta potencial para a produção de peptídeos não-ribossomais (AYUSO; CLARK; GONZÁLEZ, 2005; GENILLOUD, 2005).

Já os mecanismos indiretos, que levam à proteção da planta, acontecem quando os vegetais desenvolvem respostas a estresses. Algumas dessas respostas estão limitadas ao órgão danificado, mas outras se espalham e auxiliam toda a planta (ROMERA et al. 2019). Estas últimas respostas incluem a Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) e a Resistência Sistêmica Induzida (RSI). A RSA é desenvolvida quando patógenos e insetos acometem a planta induzindo o acúmulo de ácido salicílico, que é uma molécula sinal para a secreção de proteínas relacionadas à patogênese, proteínas estas que possuem atividades antimicrobianas (SPOEL e DONG, 2012). Por outro lado, a RSI é mediada por microrganismos benéficos que desencadeiam a biossíntese dos hormônios vegetais ácido jasmônico e etileno, que por sua vez, estimulam o desenvolvimento da resistência sistêmica nas plantas (PIETERSE et al. 2014).

2.3 IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

Análises moleculares se somaram às análises morfológicas para classificação de microrganismos. Isso torna-se necessário, pois as características fenotípicas de alguns microrganismos não são distintivas e, principalmente, porque suas morfologias se alteraram de acordo com as condições de cultivo (DU et al. 2012). O uso da sequência do gene 16S rRNA

(subunidade menor do ribossomo) passou a ser utilizado como método padrão na análise filogenética de bactérias e desta forma, estudos iniciaram o uso de sequenciamento total ou parcial de genes ribossomais para classificar microrganismos (GUEST et al. 2017). Isso se deve, principalmente, ao fato de que o gene 16S rRNA cumpre a maior parte dos requisitos de um bom marcador filogenético, pois ocorre onipresentemente em bactérias e tem função indispensável na síntese proteica, que por sua vez está ligada à sua conservação evolutiva. No entanto, a principal desvantagem do uso do gene 16S rRNA como marcador filogenético é sua resolução insuficiente no nível de espécie, devido a seu nível de conservação (GLAESER E KÄMPFER, 2015).

Uma maior resolução dentro dos gêneros pode ser obtida com análises filogenéticas adicionais baseadas em genes codificadores de proteínas conservadas, envolvidas em processos celulares essenciais chamados de genes *housekeeping* que evoluem em taxas lentas e constantes (GLAESER E KÄMPFER, 2015). Desse modo, uma vez que a análise de uma única proteína não reflete as relações filogenéticas gerais, filogenias baseadas em múltiplos genes foram introduzidas e têm sido usadas para definição de espécies, e esse é o caso da análise MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) (GEVERS et al. 2005). Dessa forma, na maioria das vezes uma linhagem desconhecida é primeiramente classificada ao nível de gênero com base no gene 16S rRNA e então, a análise por MLSA é aplicada a fim de se obter um poder de resolução maior entre espécies dentro de um gênero.

Após a realização da filogenia, outra técnica que pode ser utilizada para confirmar a espécie do microrganismo é a análise por reações em cadeia da polimerase (PCR) espécie-específica, onde se utilizam *primers* que amplificam regiões presentes exclusivamente em uma única espécie confirmando, assim, a classificação do microrganismo (DUNLAP, 2019; LITAKER et al., 2019; MARCHE et al., 2019; PEČENKA et al., 2020).

O gênero *Bacillus* foi descrito por Cohn em 1872 e, de acordo com a última atualização da lista de nomes disponíveis na LPSN (*List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature*) haviam 284 espécies pertencentes ao gênero *Bacillus*. Para classificações moleculares em MLSA, entre os genes *housekeeping* mais utilizados para identificação de espécies do gênero *Bacillus*

estão os genes: *gyrA* (*DNA gyrase subunit A*) que codifica uma topoisomerase tipo II que alivia a tensão da dupla fita auxiliando na replicação, transcrição, recombinação e reparo do DNA; *recA* (recombinant protein A) que se trata de uma proteína multifuncional envolvida na recombinação homóloga e no reparo do DNA; e *rpoB* (*RNA polymerase subunit β*) que catalisa a transcrição do DNA em RNA (BATEMAN, 2019).

2.3.1 Análises filogenéticas

A história dos organismos é formada por uma série de mudanças evolutivas que são hereditárias e, portanto, derivadas da ancestralidade (CALDART, 2016). Sistemas de classificação que levam em conta a evolução entre as espécies podem ser representados através de reconstruções filogenéticas que estimam a relação entre os organismos inferindo sua história comum (MATA et al. 2009; MAURÍCIO et al. 2008). Para fazer isto, podem ser utilizadas sequências de nucleotídeos ou aminoácidos, de modo que locais homólogos são comparados uns com os outros, classificando assim o organismo de interesse (ROKAS e CARROLL, 2005).

Para a construção de uma árvore filogenética a partir de uma matriz de dados é preciso definir um modelo de substituição de nucleotídeos ou aminoácidos, também chamado de modelo evolutivo (MASCHINEN et al., 2009). Há uma série de modelos evolutivos disponíveis a serem considerados, dos mais simples aos mais complexos. Essa progressão na complexidade é caracterizada pelo aumento do número de parâmetros considerados nas análises e as estratégias de seleção do modelo evolutivo buscam encontrar o nível adequado de complexidade baseado nos dados disponíveis (POSADA E CRANDALL, 2001). Certa cautela é necessária quando estamos procurando o melhor modelo para dados heterogêneos. Por exemplo, para análises que incluam mais de um gene ou regiões codificantes e não-codificantes, ou seja, regiões genômicas que estão sujeitas a diferentes pressões seletivas e limitações evolutivas, um único modelo evolutivo não representará todos os dados. Dessa forma, uma solução é realizar a análise dos dados separadamente para cada gene ou região (POSADA, 2008).

Após a escolha do modelo evolutivo, o próximo passo é optar por um método de reconstrução filogenética que pode ser baseado em matrizes de distâncias (a matriz de dados é transformada em uma matriz de distância) ou em análise de caracteres (os nucleotídeos são analisados sítio a sítio) (CALDART, 2016). A inferência Bayesiana é um método probabilístico baseado em análise de caracteres desenvolvido por Thomas Bayes no século XVIII e sua principal característica é o uso de distribuições de probabilidade para descrever a incerteza de todas as incógnitas, incluindo o parâmetro modelo (NASCIMENTO et al. 2017). Na maior parte dos casos, todas as árvores são consideradas igualmente prováveis *a priori*, e a probabilidade *a posteriori* é calculada através de modelos de evolução de nucleotídeos ou aminoácidos (HUELSENBECK et al., 2001). Entretanto, a busca pela árvore mais provável entre todas as possibilidades não seria possível, dessa forma, a solução encontrada para esta limitação é a utilização de estratégias heurísticas, ou seja, que simplificam e ignoram passos para tornar a análise factível em um tempo hábil. Um dos algoritmos utilizados é a estimativa da probabilidade posterior por aproximação através de amostragem aleatória por Cadeias Markovianas (*Markov chain Monte Carlo* - MCMC) (RONQUIST E DEANS, 2010). A ideia central é de fazer pequenas mudanças aleatórias nos parâmetros e, depois, aceitá-las ou rejeitá-las de acordo com a probabilidade (RONQUIST et al., 2012). Por fim, essas análises darão origem a uma árvore filogenética proposta que pode ajudar a inferir a classificação de um microrganismo de interesse.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Prospectar isolados bacterianos provenientes de raízes de milho quanto ao seu potencial no controle de fungos pertencentes ao complexo de podridão no colmo em milho (*Zea mays* L.).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar *in vitro* a capacidade de nove isolados bacterianos de milho em inibir o desenvolvimento dos fungos *Colletotrichum graminicola*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella* sp., por meio de cultura pareada e ensaios para detecção da produção de metabólitos voláteis e não-voláteis.
- Identificar em nível de espécie os isolados bacterianos selecionados pelo melhor desempenho nos ensaios *in vitro*, por meio de análise multilocus.
- Caracterizar as possíveis rotas metabólicas associadas ao antagonismo, por meio de PCR específica dos genes relacionados a via biossintética NRPS, bem como aos compostos nela sintetizados, como fengicinas e surfactinas.
- Analisar a resposta agrônômica do isolado bacteriano selecionado pelo melhor desempenho nos ensaios *in vitro* frente aos fungos *Colletotrichum graminicola*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella* sp. em experimento em casa de vegetação.
- Avaliar a colonização bacteriana do isolado selecionado pelo melhor desempenho nos ensaios *in vitro* para o experimento *in vivo* por meio de técnicas de reisolamento.

4 ARTIGO

Title: Potential Effect of Endophytic *Bacillus velezensis* Against Stalk Rot Fungi in Maize (*Zea mays* L.)

4.1 ABSTRACT

Stalk rot is one of the most serious diseases in maize and effective control measures are currently lacking. Therefore, this study aimed to investigate possible biological agents for the management of this disease. One of this agent is a endophytic bacterial strain isolated from maize roots (LGMB141) and identified as *Bacillus velezensis* based on *multilocus* analyses of the genes 16S rRNA, *gyrA*, *recA* and *rpoB*. This one had considerable antifungal effect on the *in vitro* mycelial growth of the fungi *Colletotrichum graminicola*, *Stenocarpella* sp., *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides*, with more than 70% of growth inhibition. This isolate also showed positive responses regarding the presence of genes related to the biosynthesis pathway of antimicrobial compounds (NRPS), as well as for the lipopeptides synthesized in these pathways, exemplified here by the peptides surfactin and fengicin. Consequently, *B. velezensis* strain LGMB141 has potential as agent of biocontrol against maize stalk rot caused by fungi *Colletotrichum graminicola*, *Stenocarpella* sp., *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides*.

Keywords: Biocontrol; *Bacillus velezensis*; Maize Stalk rot;

4.2 INTRODUCTION

There is a global need to meet the growing food demand of the human population (Alexandratos et al. 2012; Chakraborty e Newton 2011). Currently, corn production is protected from phytopathogens and adverse climatic conditions by chemical pesticides and by the selection of resistant plant genotypes (Boyd et al., 2013; Carvalho, 2017). However, both strategies have

limitations. Pesticides are not effective against all diseases and can pose a risk to health and to the environment with toxic residues that can accumulate in the soil and subsequently pass into food (Cheng et al. 2019 e Pal, 2006). In relation to the case of resistant plants selected via genetic improvement, this resistance can be overcome by mutant pathogens in a few years, with the continued need for the sealing of new cultivars resistant to phytopathogens (McHughen e Wager, 2010). Therefore, the application of microorganisms that can act in the biocontrol of phytopathogenies emerges as an environmentally sustainable alternative for widespread approaches (Berg, 2009; Saravanakumar et al., 2017; Wang et al., 2020). In this scenario, achieving food security is one of the main global challenges in the next years and this does not imply only the use of safe food for consumers, but making both safer food from the human health perspective and with lowering the impact on the environment (FAO, 2009). Furthermore, developing new tools for a sustainable agriculture perfectly fits with the public concerns constantly addressed to safe, high quality and pesticide-free food and feed (Sarrocco e Vannacci, 2018).

Maize is one of the crops that can benefit from the use of biocontrol. Currently, this culture is one of great worldwide importance due to its various uses, mainly in animal feed, but also in human food and as a raw material for diverse industries (Nuss e Tanumihardjo, 2010; Ranum, Peña-Rosas e Garcia-Casal, 2014). Among the causes that can be attributed to the decrease in maize production, losses caused by plant pathogens and agricultural pests play a crucial role, since they are responsible for losses estimated at 22,5% of the global production of this crop and about 6,5% of this percentage are relative to the maize stalk rots (Savary et al., 2019), which in Brazil, are mainly caused by the fungi *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Colletotrichum graminicola* and *Stenocarpella* sp (Nesi, 2016).

One of the alternatives for the treatment of plant diseases is the use of microorganisms for biocontrol (Li et al., 2018). Bacteria strains are investigated and species of the genus *Bacillus* are highly promising (Torres et al., 2017). *Bacillus velezensis* was reported like inhibitor of the growth of many pathogenic fungi, such as *Cryphonectria parasitica*, *Helicobasidium purpureum*, *Cylindrocladium quinquesepatum*, *Aspergillus flavus* (Xu, Zhu e Li, 2016)

Cylindrocladium quinqueseptatum (Xu, Zhu e Li, 2016), *Ralstonia solanacearum*, *Fusarium oxysporum* (Cao et al., 2018), and *Rhizoctonia solani* (Chowdhury et al., 2013). Biocontrol can be related to the biosynthesis of lipopeptides (surfactin, iturin, and fengycin, for example), which are synthesized independently of ribosomal machinery, in large enzymatic complexes called *Nonribosomal peptide synthetase* (NRPS) (Martínez-Núñez e López, 2016).

Another challenge besides finding promising microorganisms for agricultural use, is to create ways that facilitate the use of these products by the farmer (Bashan et al., 2014). The liquid products conventionally used have a few disadvantages of like the limited shelf life, cold conditions required for long-term storage and increased costs, facts that limit their use in some cases (Stephens e Rask, 2000). One of the possibilities to replace the liquid products are the alginate capsules, since the preparation of these structures containing bacteria is quite simple and this formulations are non-toxic, biodegradable and microorganisms slow released into the soil, increasing the efficiency of inoculated microorganisms (Bashan et al., 2002).

Therefore, as there are few studies directed to the use of *B. velezensis* in maize stalk rots and there are also no reports of different forms of use of this bacterium in the field, the objective of this work was to evaluate the potential of a strain of *B. velezensis* isolated from maize roots, which previously indicated potential control *in vitro* against fungal diseases in maize leaves (Ikeda et al., 2018), searching answers for questions regarding its mode of action and its viability for use as an biocontroler in maize crop.

4.3 MATERIAL AND METHODS

4.3.1 Biological material

Nine bacterial strains previously isolated from maize roots by Ikeda et al. (2013), and deposited at belonging to the Laboratory of Genetics of Microorganisms Collection (LabGeM) of the Federal University of Parana (UFPR), were used in this study. Eight of them (LGMB141, LGMB143,

LGMB152, LGMB159, LGMB178, LGMB221, LGMB 235 and LGMB242) have already been tested for their biocontrol potential against maize fungi *Alternaria* sp.,

Diaporthe sp., *Cercosporazeae maydis*, *Bipolaris maydis*, *Fusarium verticilloides* and *Colletotrichum graminicola* from leaves (Ikeda et al., 2018). In addition to these bacteria, another strains (LGMB194) from the same collection was included in this study. All bacteria strains were stored in agar nutrient (NA) culture medium under refrigeration (4°C). Fungal strains related to corn stalk rots are also deposited in the same UFPR collection, were grown stored in potato dextrose agar (PDA) medium: *Fusarium graminearum* LGMF1657, *Fusarium verticilloides* LGMF1693, *Colletotrichum graminicola* LGMF1815 and *Stenocarpella* sp. LGMF1822.

4.3.2 Bacterial identification

Extraction of bacterial DNA

Genomic DNA extraction was performed according to Szilagyi-Zecchin et al. (2014) with the following modification: bacteria were grown overnight in 3 mL of LB medium (Luria Bertani) instead of DYGS medium.

Amplification, sequencing, and analysis of the 16S rRNA gene

The amplification was performed by PCR (Polymerase Chain Reaction) with primers fD1 (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') and rD1 (5'AAGGAGGTGATCCAGCC3') (Weisburg et al., 1991) as described by Menna et al. (2006). The samples were sequenced by the company GoGenetic (Curitiba, Brazil) by capillary electrophoresis in an automatic DNA sequencer model *ABI PRISM 3500 Genetic Analyser*. After sequenced the 16S rRNA gene, it was possible to propose the genus of the nine bacterial strains by

comparing the samples sequences with GenBank data available in NCBI (National Center for Biotechnology Information) using the BLAST tool.

Amplification, sequencing, and analysis of the *gyrA*, *recA* and *rpoB* genes

To identify the species of bacterial strains, three genes were amplified for multilocus analysis: *gyrA*, *recA*, and *rpoB*, with the following primers:

PRIMERS	SEQUENCES 5'3'	REFERENCES
<i>gyrA</i> -42f	CAGTCAGGAAATGCGTACGTCCTT	Rooney et al., 2009
<i>gyrA</i> -1066r	CAAGGTAATGCTCCAGGCATTGCT	Rooney et al., 2009
<i>recA</i> -f	GATCGTCAAGCAGCCTTAGAT	Rooney et al., 2009
<i>recA</i> -r	TTACCGACCATAACGCCGAC	Rooney et al., 2009
<i>rpoB</i> -2292f	GACGTGGGATGGCTACAAC	Mohkam et al., 2016
<i>rpoB</i> -3354r	ATTGTCGCCTTTAACGATGG	Mohkam et al., 2016

The PCR reactions were performed with a final volume of 12.5 µL, containing 1 X PCR buffer, 3 mM MgCl₂; 0.2 mM dNTPs; 1.2 µM of each primer; 0.75 U of Taq DNA polymerase and 100 ng of genomic DNA. The reaction was processed in a thermocycler (BIO-RAD T100™ Thermal cycler) for each gene according to the literature (Mohkam et al., 2016; Rooney et al., 2009). The products resulted from PCR were submitted to electrophoresis in agarose gel for 3 h at 4 v/cm and stained with ethidium bromide, in order to confirm the amplification of the gene regions of interest. The samples were sequenced by the company GoGenetic (Curitiba, Brazil).

Phylogenetic analyses

The genes sequences obtained were edited in the BioEdit software version 7.2.5 and aligned in the MEGA v.7 software (Kumar, Stecher e Tamura, 2016) using the MUSCLE tool (Edgar, 2004) in a codon-wise manner for coding sequences. The sequences of the reference species were obtained from the

database "*list of prokaryotic names with standing in nomenclature*" (<http://www.bacterio.net/>). Bayesian phylogenetic inference trees were generated using the MrBayes software (3.2.7a) (Ronquist et al., 2012) using partitioned analysis by codon position, using the appropriate evolutionary model for each gene, including the four genes sequenced in the MLSA analysis (Christensen *et al.*, 2004; Paraskevopoulos *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2005). The MCMC convergence was accessed by both Tracer (Rambaut et al., 2018) and RWTY r package (Warren et al., 2017) and each tree was edited with the help of FigTree version 1.4.3.

4.3.3 Biocontrol of phytopathogenic fungi *in vitro*

The paired culture test was performed according to Shiomi (2008). The nine bacterial strains used in this study were tested against the fungi *Colletotrichum graminicola*, *Stenocarpella* sp., *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides*. The experiment was carried out in triplicate and a bacterium belonging to a genus *Shigella* (LGMB159) that contains species related to human pathogens was used as control. The results were statistically analysed in GraphPad Prism version 6.01 by means of ANOVA followed by Dunnet test at 1% probability.

4.3.4 Proposal of biocontrol mechanisms

Analysis of volatile and non-volatile compounds

The bacteria strains with the best performance in the previous test were evaluated for their production of volatile and non-volatile metabolites. The production of non-volatile metabolites was evaluated according to the method described by (Oliveira et al. 2015). Petri dishes containing only the fungus and methanol, used as a metabolite vehicle, were the control.

The production of volatile metabolites was investigated according to the method described by (Catellan, 2009). The experiment was carried out in Petri dishes with partitions, where on one side the bacteria of interest was inoculated and on the other was inoculated a mycelium disc of the fungus to be inhibited. Petri dishes containing only the fungi were used as control.

Both experiments were performed in triplicate and statistically analysed in GraphPad Prism version 6.01 employing ANOVA followed by Dunnet test at 5% probability.

Amplification of genes of the pathway NRPS

Gene amplification reaction was first performed to the adenylation domain of the NRPS enzyme with primers: A3F (5'GCSTACSYSATSTACACSTCSGG3') and A7R (5'SASGTCVCCSGTSCGTA3') (Genilloud, 2005). For the strains that amplified in the previous PCR followed to the amplification of regions encoding the products fengicin and surfactin of these pathways, with the following primers:

PRIMERS	SEQUENCES 5'3'	REFERENCES
<i>fenD</i> -f	GGCCCGTTCTCTCTAAAATCCA	Bartel et al., 2019
<i>fenD</i> -r	GTCATGCTGACGAGAGCAAA	Bartel et al., 2019
<i>srfA</i> -f	TCGGGACAGGAGaAGACATCAT	Bartel et al., 2019
<i>srfA</i> -r	CCACTCAAACGGATAATCCTGA	Bartel et al., 2019

PCR reactions were performed with a final volume of 25 µL, containing 1X PCR buffer; 1.5 mM MgCl₂; 0.2mM dNTPs; 0.5 µM of each primer; 1 U of *Taq* DNA polymerase and 200 ng of genomic DNA. The products resulting from PCR were submitted to electrophoresis in agarose gel for 2 hours at 4 v/cm, and stained with ethidium bromide in order to confirm the amplification of the gene regions of interest. The PCR product size expected are: 700 bp for A3F and A7R primers; 269 bp for *fenD*-f and *fenD*-r primers; and 201 bp for *srfA*-f and *srfA*-r primers.

4.3.5 *In vivo* biocontrol assay

Bacterial encapsulation

The most promising bacterium was selected in the *in vitro* assays and used for the *in vivo* assay. A new alternative for inoculation via encapsulation was evaluated in a greenhouse experiment. The bacterial strain selected was previously grown overnight in LB liquid medium and standardized to a concentration of 10^8 cells/mL. Subsequently, it was encapsulated following a method proposed by (Sanhueza e Melo, 2008). The capsules were produced by drip in a calcium chloride solution (0.25 M). After drying at 30°C in an oven, the granules were stored at 4°C until their use.

Greenhouse experiment

The *in vivo* bacterial colonization test was conducted in a greenhouse located in the Forest Sciences sector of the Federal University of Paraná. The maize hybrid AG8061, which has moderate tolerance to fungal disease attack, was selected for this experiment. Before sowing, corn seeds were disinfested with 70% alcohol, sodium hypochlorite 3%, and distilled water, and then received the procedures compatible with each treatment of the assay. Seeds that received the bacterial isolate in liquid culture medium (bacterium selected for the best *in vitro* performance grown in LB liquid medium, at a concentration of 10^8 cells/mL) were soaked in solution for two hours and then dried at room temperature overnight. For the treatments in which the bacterium was introduced in an encapsulated way, the number of capsules per vessel was applied to ensure the same amount of bacteria provided by the liquid preparation, which resulted in four capsules per vessel.

To evaluate the success of bacterial colonization, five plants were evaluated 10 days after emergence. The roots of the collected plants were superficially disinfested with 70% alcohol and 3% hypochlorite and five

fragments of each root were inoculated in solid nutrient agar (NA) for bacterial reisolation. As soon as the bacteria appeared in the plates they were purified for subsequent DNA extraction and PCR amplification of the gene of sugar kinase, which is specific for the identification of *B. velezensis*. The primers used were *Bvel-F* (5'-CCTTTGCGTTTTGTTACCC-3') and *Bvel-R* (5'-CACATCAATTCCTTCTCC-3') using conditions published elsewhere (Dunlap, 2019).

4.4 RESULTS

4.4.1 Bacterial identification

The bacterial isolates identified by phylogenetic analysis of 16S rRNA gene were classified as belonging to the genera *Bacillus* (LGMB141, LGMB143, LGMB152, LGMB178, LGMB194, LGMB235 and LGMB242), *Shigella* (LGMB159) and *Enterobacter* (LGMB221). Phylogenetic analyses continued only with *bacillus* strains. A Bayesian inference tree was constructed to determine which clade the isolates belonged (Figure 1, Suppl. Figure 1). At this point, it was possible to identify that the isolates LGMB141, LGMB143, LGMB152 and LGMB242 belong to the same clade, including *Bacillus subtilis* or *Bacillus velezensis* isolates.

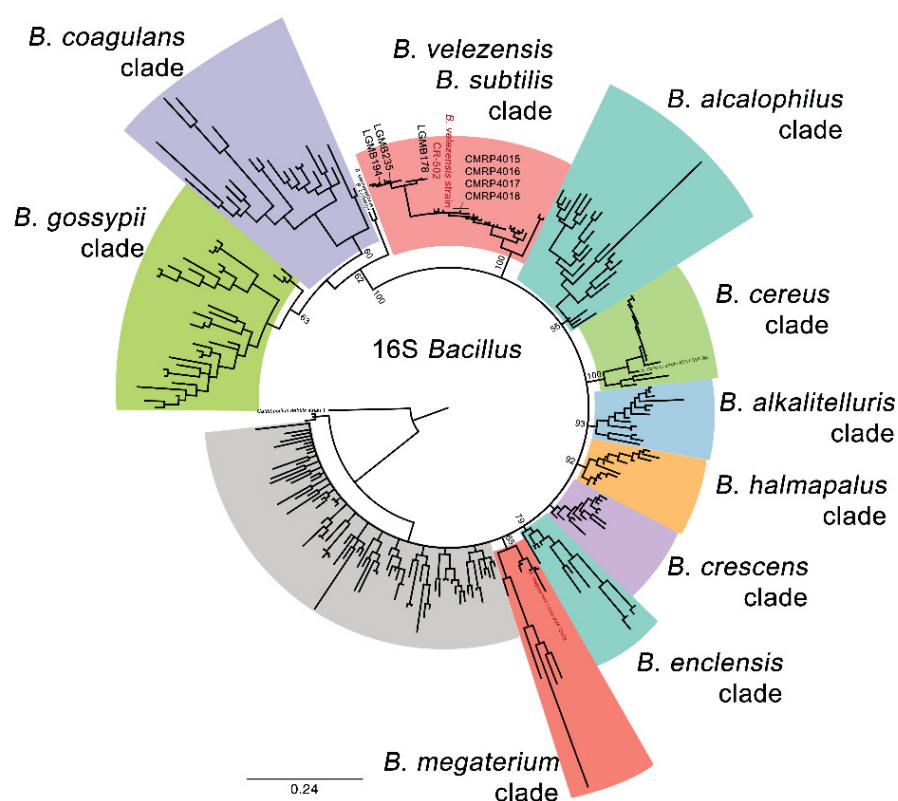


FIGURE 1. Bayesian inference tree based on the 16S *rRNA* gene. *Bacillus* LGMB141, LGMB143, LGMB152 and LGMB242 belong to *Bacillus velezensis* clade. The species *Caldibacillus debilis* was used as outgroup. Values on the node indicate posterior probabilities. Scale bar indicates substitutions per nucleotide position.

In the MLSA with the genes 16S *rRNA*, *gyrA*, *recA* and *rpoB*, it was possible to classify these four isolates as *Bacillus velezensis*, it is even possible to infer that these four strains are clones of the same strain of this species (Figure 2).

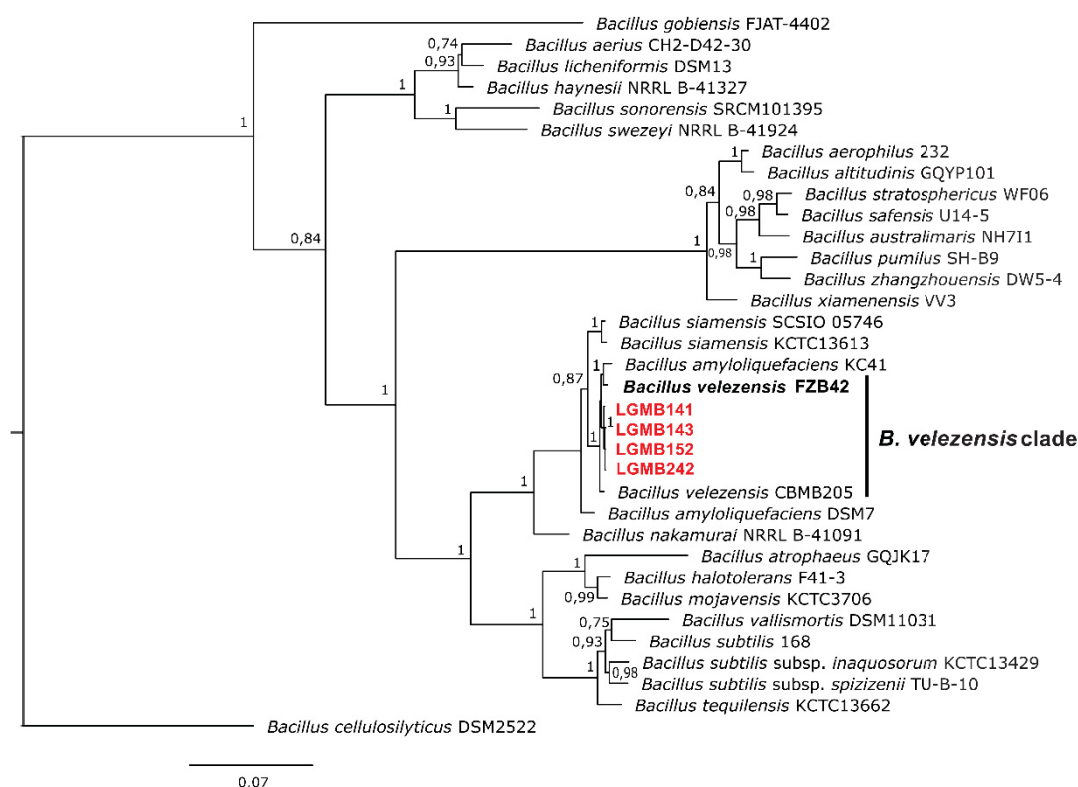


FIGURE 2. Bayesian inference tree based on the Multilocus Sequence Analysis, with the genes *16S rRNA*, *gyrA*, *recA*, and *rpoB*. *Bacillus* LGMB141, LGMB143, LGMB152 and LGMB242 belong to *Bacillus velezensis* species. The species *Bacillus cellulosilyticus* was used as an outgroup. The type strain of *B. velezensis* is marked in bold. Scale bar indicates substitutions per nucleotide position.

4.4.2 Biocontrol of phytopathogenic fungi *in vitro*

In the paired culture test, seven of the nine isolates tested showed significant differences in the growth control of *Colletotrichum graminicola*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella* sp. fungi (Figure 3). Isolates LGMB178, LGMB194, and LGMB235 obtained positive responses when evaluated at up to 5% probability ($p < 0.05$), with a control of 32% of fungal growth in relation to a human pathogen bacteria (LGMB159), which does not control phytopathogenic fungi.

Moreover, the isolates LGMB141, LGMB143, LGMB152 and LGMB242 were significant in up to 1% probability ($p < 0.01$) controlling up to 72% of fungal

growth in comparison to a human pathogen bacteria (LGMB159). Isolate LGMB141 was selected for subsequent tests due to the lowest mean fungal growth (Figure 3).

In the production of volatile and non-volatile metabolites, none of the results obtained statistical differences between treatments (data not shown).

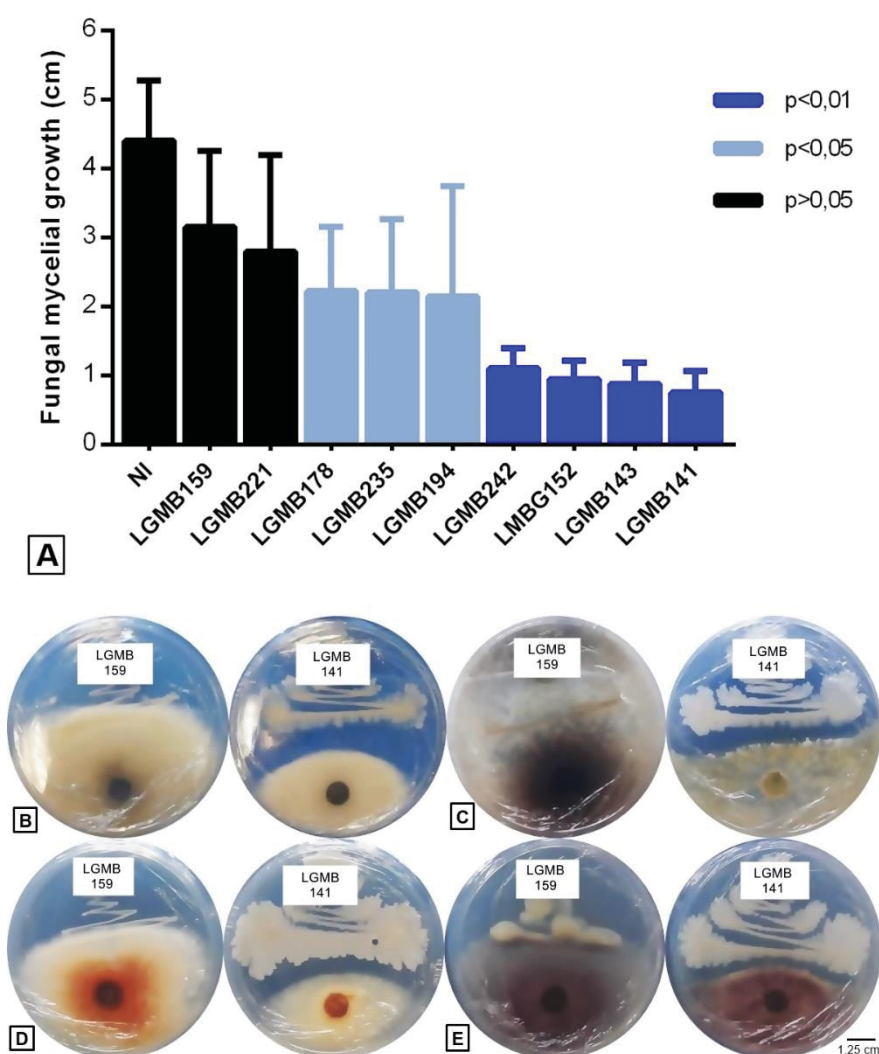


FIGURE 3. Fungal mycelial growth in the presence of bacterial isolates. A - The NI (not inoculated) bar corresponds to fungal growth without the presence of bacteria. The error bars represent the standard deviation. The p values were obtained by ANOVA followed by Dunnet test. Replicates $n = 3$. The plates figures Petri dishes represent the fungal growth in the presence of a bacterium with potential for biocontrol (LGMB141) and a non-controlling bacterium of phytopathogens (LGMB159). B - *Colletotrichum graminicola* C - *Stenocarpella* sp. D - *Fusarium graminearum* E - *Fusarium verticillioides*.

4.4.3 Proposal of biocontrol mechanisms

In the amplification reaction for the adenylation domain of the enzyme NRPS (Figure 4A), the four isolates identified as *B. velezensis* (LGMB141, LGMB143, LGMB152 and LGMB242) were the only ones that evidenced the presence of this gene (Fig. 4B). One of these isolates (LGMB141) was also investigated for the presence of genes encoding one of the regions necessary for the formation of two secondary metabolites formed by NRPS enzymes, being surfactin (Fig. 4C) and fengicin (Fig. 4D), and the response was positive for both genes tested.

4.4.4 *In vivo* biocontrol assay

Bacterial reisolation

Nine bacterial isolates were obtained from the reisolation process from roots of the different treatments performed in greenhouse. Of these, four were identified as *B. velezensis* in the species-specific PCR test performed. This PCR was also performed for the four isolates previously identified as *B. velezensis* (LGMB141, LGMB143, LGMB152 and LGMB242), to confirm the efficacy of amplification. In this sense, the isolate LGMB194 (*Bacillus* sp.) and a strain of *Escherichia coli* were also added to the reaction, which, as expected, did not obtain amplification during the PCR process (Figure 5).

Reisolated strains that obtained amplification came from the following treatments: LGMB194 inoculated, Without inoculation, LGMB141 inoculated in capsule and LGMB141 inoculated in solution (Figure 5).

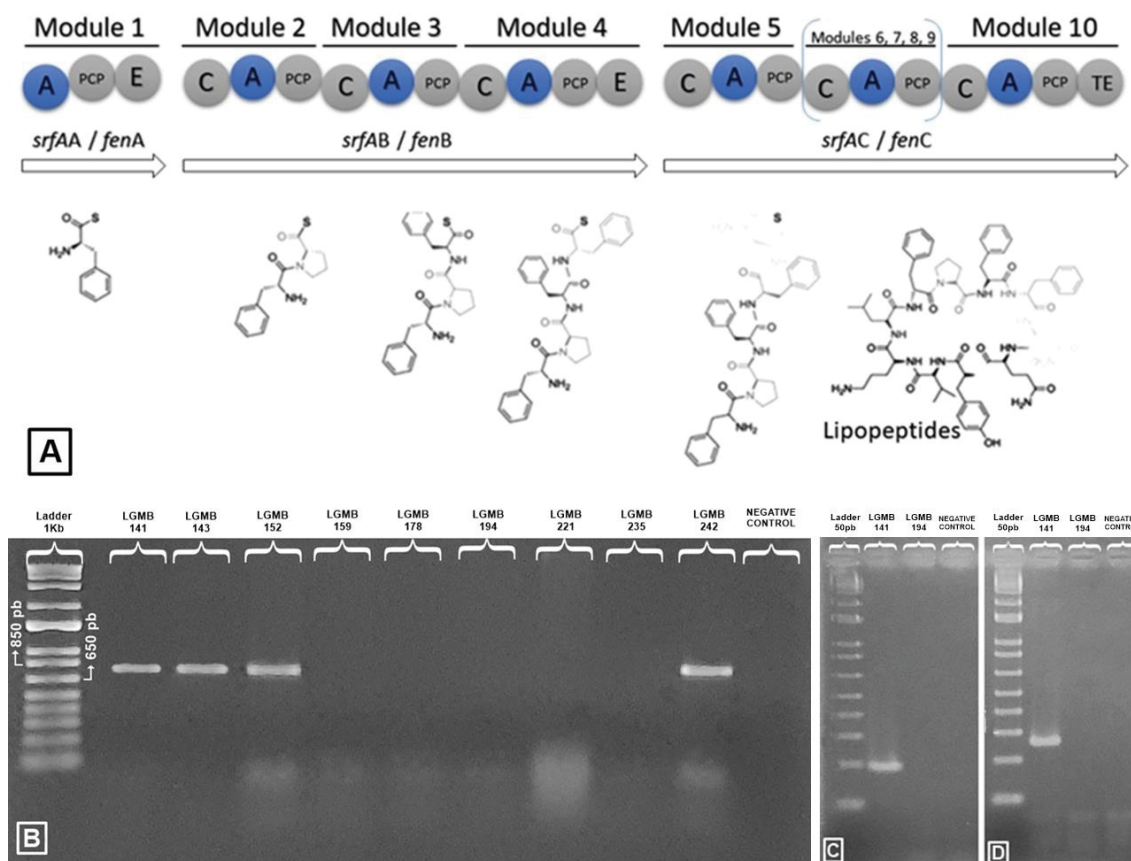


FIGURE 4. Identification of genes related to biocontrol. A - Representation of the synthesis of lipopeptides such as surfactins and fengicins, where each module, guided by the gene (*srfA*, *fen*) corresponding to the product that will be formed, adds an amino acid to the chain of the protein that will be formed. The adenylation domain highlighted in blue was the amplified region that appears in the agarose gel of figure 4b. B - Agarose gel of the PCR products from using the gene of adenylation domain of the enzyme NRPS. All isolates amplified belong to the species *Bacillus velezensis*. The others isolates correspond to other species of the genus *Bacillus*. C and D - Agarose gels of the PCR products from using the genes correlated with the surfactin and fengicin metabolites, respectively.

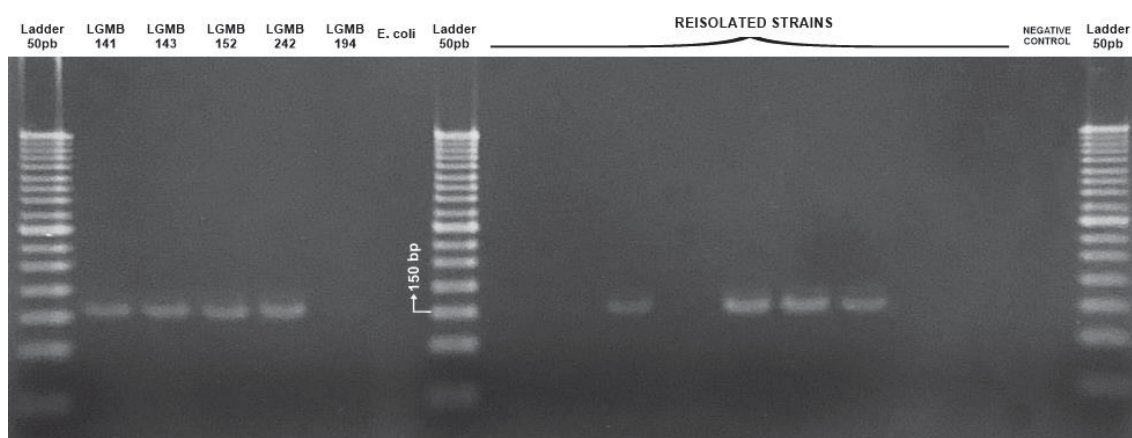


FIGURE 5. Agarose gel of the PCR products from using Bvel-F and Bvel-R primers. Reisolated strains that obtained amplification came from the following treatments: LGMB194 inoculated, without inoculation, LGMB141 inoculated in capsule and LGMB141 inoculated in solution.

4.5 DISCUSSION

Considering the few alternatives available for the control of phytopathogenic fungi without the use of chemicals, it is important to search for microorganisms that can act in the biocontrol of plant pathogens. In our study, we investigated nine bacterial strains isolated from maize roots with possible antagonistic action to fungi that cause maize stalk rot. Among the nine strains that we started this work, two of them were identified as human pathogenic belonging to the genera *Shigella* and *Enterobacter* (Dekker and Frank, 2016; Fernández-García et al., 2016). The fact that soils are potential reservoirs for human pathogens is widely known (Boschiroli et al., 2015). The other seven bacteria from our study belong to the genus *Bacillus*. From this data, we can already infer about the responses obtained in the *in vitro* antagonism test against phytopathogenic fungi, where only the two genera considered human pathogenic did not obtain significant positive responses in the fungal control. The seven bacteria showed that they have some inhibitory effect on such pathogens, as reported for other bacteria of the genus *Bacillus* (Caulier et al., 2019). Among the seven isolates identified as *Bacillus*, four of them were more responsive in fungal inhibition *in vitro* and all of them were identified as *B. velezensis* in the MLSA analysis we performed. This species has been studied in recent years due to its biocontrol potential. A product containing the strain FZB42 of *B. velezensis* called RhizoVital is available at the market for control of fungal diseases of various crops such as lettuce, carrot, potato, cotton, corn, tomato and some fruits (Li, 2016). Regarding the specific control of fungi that cause maize stalk rot, there are several studies in which the genus *Bacillus* is responsive to the control of fungi *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Colletotrichum graminicola* and *Stenocarpella* sp. considering *in vitro* and *in vivo* assays (Bressan e Figueiredo, 2005; Cavaglieri et al., 2005; Cheng et al., 2018; Figueroa-López et al., 2016; Parikh, Eskelson e Adesemoye, 2018). However, our study is pioneer in the report of *B. velezensis* controlling fungi that cause maize stalk rot, so there are no specific reports of *B. velezensis* in the control of these diseases and our study come up with results that indicate that this control may be possible with our *B. velezensis* isolate (LGMB141).

In addition to *in vitro* control, we were able to identify some evidence that the biocontrol mechanism of our *B. velezensis* strains is via secondary metabolites. This was evidenced by PCR amplifications of genes that indicate the presence of non-ribosomal enzymes, which are responsible for the production of metabolites like fengicin and surfactin, which have already been reported as active in the control of phytopathogens (Caulier et al., 2019; Hanif et al., 2019; Rabbee et al., 2019).

Another important aspect in the use of bacteria for biocontrol is its capacity of colonization when artificially inserted in the culture medium (Santos, Nogueira e Hungria, 2019). We tried to evaluate colonization by means of species-specific PCR and reisolation techniques, however, even in treatments in which we did not inoculate our strain of *B. velezensis* this species was found. This can be explained because *B. velezensis* is an endophytic bacterium of maize and, may be present in the seed as reported in other studies (Kumar, James e White, 2019; Yang et al., 2020). Therefore, reisolation techniques may not be adequate. This makes difficult to verify the success of inoculation, appointing *in vivo* experiments only with reisolation techniques. It makes necessary to the need of using other techniques, such as the use of genetically modified bacteria with fluorescent markers (Fan et al., 2011).

In conclusion, our results indicate that *B. velezensis* strains are promising for agricultural use in the control of phytopathogens. Further studies will be performed with the strains from our study to get more details about their mechanisms of biocontrol, as well as their effect under field conditions.

5 REFERENCES

- ALEXANDRATOS, N.; BRUINSMA, J. F. World Agriculture Towards 2030/2015: The 2012 Revision. **ESA Working Paper**. n. 03, 2012.
- AYUSO, A.; CLARK, D.; GONZÁLEZ, I. A novel actinomycete strain de-replication approach based on the diversity of polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic pathways. p. 795–806, 2005.
- AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J. M. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens - An overview of the mechanisms involved. **Mycorrhiza**, v. 6, n. 6, p. 457–464, 1997.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J.; FERNÁNDEZ, F. J.; TOMASINI, A. Microbial Secondary Metabolites Production and Strain Improvement. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 322–333, 2003.
- BASHAN, Y. *et al.* Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, n. 5, p. 359–368, 2002.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L.; PRABHU, S. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). **Plant and Soil**, v. 378, n. 1–2, p. 1–33, 2014.
- BATEMAN, A. UniProt: A worldwide hub of protein knowledge. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D506–D515, 2019.
- BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 11–18, 2009.
- BETTIOL, W. *et al.* Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas. 2012.
- BOSCHIROLI, M. L. *et al.* Natural Soil Reservoirs for Human Pathogenic and Fecal Indicator Bacteria. **Manual of Environmental Microbiology**, p. 3.3.2-1- 3.3.2-12, 2015.
- BOYD, L. A. *et al.* Plant-pathogen interactions: Disease resistance in modern agriculture. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 4, p. 233–240, 2013.
- BRESSAN, W.; FIGUEIREDO, J. E. F. Biological control of *Stenocarpella maydis* in maize seed with antagonistic *Streptomyces* sp. isolates. **Journal of Phytopathology**, v. 153, n. 10, p. 623–626, 2005.
- CALDART. Análise filogenética: conceitos básicos e suas utilizações como ferramenta para virologia e epidemiologia molecular. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, n. September, p. 1–20, 2016.

CAO, Y. *et al.* Antagonism of Two Plant-Growth Promoting *Bacillus velezensis* Isolates Against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018.

CARVALHO, F. P. Pesticides, environment, and food safety. **Food and Energy Security**, v. 6, n. 2, p. 48–60, 2017.

CATELLAN. Métodos Qualitativos para Determinação de Características Bioquímicas e Fisiológicas Associadas com Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal. 2009.

CAULIER, S. *et al.* Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–19, 2019.

CAVAGLIERI, L. *et al.* Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* *in vitro* and at the maize root level. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 5–6, p. 748–754, 2005.

CHAKRABORTY, S.; NEWTON, A. C. Climate change, plant diseases and food security: An overview. **Plant Pathology**, v. 60, n. 1, p. 2–14, 2011.

CHENG, X. *et al.* Running title: Identification and biocontrol effects of *B. methylotrophicus* TA-1 on maize stalk rot. p. 1–49, 2018.

CHENG, X. *et al.* Characterization of Antagonistic *Bacillus methylotrophicus* Isolated from Rhizosphere and Its Biocontrol Effects on Maize Stalk Rot. **Phytopathology**, v. 109, n. 4, p. 571–581, 2019.

CHOWDHURY, S. P. *et al.* Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on Lettuce Growth and Health under Pathogen Pressure and Its Impact on the Rhizosphere Bacterial Community. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1–10, 2013.

CHRISTENSEN, H. *et al.* Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the *Pasteurellaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1601–1609, 2004.

CONAB. Análise dos custos de produção e rentabilidade da cultura do milho. **Compêndio de estudos**, v.3, 2016.

CONAB. A Cultura do Milho nos anos-safra 2007 a 2017. **Campanha Nacional de Abastecimento**, v. 12, p. 54, 2018.

CONAB. Portal de informações agropecuárias. <https://www.conab.gov.br/>. 2019.

CONTINI, E. *et al.* Série desafios do agronegócio brasileiro. Milho- Caracterização e Desafios Tecnológicos. **Embrapa**, v. 5, n. 1, p. 1–45, 2019.

DEKKER AND FRANK. *Salmonella*, *Shigella*, and *Yersinia*. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2016.

DU, M.; ONDREJ, Š.; KARPÍ, R. Identification of *Lactobacilli* isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. **International Journal of Food Microbiology**, v. 159, p. 107–114, 2012.

DUNLAP, C. A. Taxonomy of registered *Bacillus* spp. strains used as plant pathogen antagonists. **Biological Control**, v. 134, n. March, p. 82–86, 2019.

DUNLAP, C. A.; BOWMAN, M. J.; SCHISLER, D. A. Genomic analysis and secondary metabolite production in *Bacillus amyloliquefaciens* AS 43 . 3 : A biocontrol antagonist of *Fusarium* head blight. **Biological Control**, v. 64, n. 2, p. 166–175, 2013.

EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.

FAN, B. *et al.* Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. **Journal of Biotechnology**, v. 151, n. 4, p. 303–311, 2011.

FANCELLI, A. L.; ALVES, L. R. A.; ALMEIDA, R. E. M. DE. A cadeia produtiva do milho. **Revista Visão Agrícola**, v. 13, n. 9, p. 1–176, 2015.

FAO. Food hygiene Basic texts. **World health organization food**. 2009.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/home/en/>. 2019.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, L. *et al.* Toxin-antitoxin systems in clinical pathogens. **Toxins**, v. 8, n. 7, p. 1–23, 2016.

FIGUEROA-LÓPEZ, A. M. *et al.* Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, 2016.

FINKING, R.; MARAHIEL, M. A. Biosynthesis of nonribosomal peptides. 2004.

FRANCESCO, A. DI; MARTINI, C.; MARI, M. Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action? **European Journal of Plant Pathology**, v. 145, n. 4, p. 711–717, 2016.

FRANK, A.; SALDIerna GUZMÁN, J.; SHAY, J. Transmission of Bacterial Endophytes. **Microorganisms**, v. 5, n. 4, p. 70, 2017.

GARCIA-CRUZ, C. H.; FOGGETTI, U. Alginato bacteriano: Aspectos tecnológicos, características e produção. **Quim. Nova**, vol. 31, n. 7, 1800-1806, 2008.

GENILLOUD, O. New PCR Primers for the Screening of NRPS and PKS-I Systems in Actinomycetes : Detection and Distribution of These Biosynthetic Gene Sequences in Major Taxonomic Groups. v. 49, p. 10–24, 2005.

GEVERS, D. *et al.* Defining prokaryotic species Reevaluating prokaryotic species. **Microbiology**, v. 3, n. September, p. 733–739, 2005.

GLAESER, S. P.; KÄMPFER, P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 237–245, 2015.

GUEST, S. *et al.* Identification of Microorganisms by Modern Analytical Techniques. v. 1607, n. 34, p. 31–35, 2017.

HANIF, A. *et al.* Fengycin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 inhibits *Fusarium graminearum* growth and mycotoxins biosynthesis. **Toxins**, v. 11, n. 5, p. 1–11, 2019.

HARDOIM, P. R. *et al.* The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 3, p. 293–320, 2015.

HUELSENBECK, J. P. *et al.* Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. **Science**, v. 294, n. 5550, p. 2310–2314, 2001.

II, F. G. RhizoVital ® 42. p. 500, 2016.

IKEDA, A. C. *et al.* Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. **Microbial Ecology**, v. 65, n. 1, p. 154–160, 2013.

IKEDA, A. C. *et al.* Bioprospecting plant growth promoting bacteria isolated from maize *Zea mays* L. roots. **Biotech Res Biochem**. 2018.

JACKSON, T. A. *et al.* Common Stalk Rot Diseases of Corn. 2009.

KLOEPPER, J. W. *et al.* Symptoms of Fern Distortion Syndrome Resulting from Inoculation with Opportunistic Endophytic Fluorescent *Pseudomonas* spp. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

KUMAR, S.; JAMES, V.; WHITE, F. Seed Endophytes. **Biology and Biotechnology**. 2019.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.

LI, H. *et al.* Isolation and evaluation of endophytic *Bacillus tequilensis* GYLH001 with potential application for biological control of *Magnaporthe oryzae*. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, p. 1–18, 2018.

LITAKER, R. W.; TESTER, P. A.; VANDERSEA, M. W. Species-specific PCR assays for *Gambierdiscus excentricus* and *Gambierdiscus silvae* (Gonyaulacales, Dinophyceae). **Journal of Phycology**, v. 55, n. 3, p. 730–732, 2019.

MARCHE, M. G.; MURA, M. E.; RUIU, L. Rapid polymerase chain reaction assays for *Brevibacillus laterosporus* detection. **Journal of Basic Microbiology**, v. 59, n. 8, p. 853–857, 2019.

MARTÍNEZ-NÚÑEZ, M. A.; LÓPEZ, V. E. L. Y. Nonribosomal peptides synthetases and their applications in industry. **Sustainable Chemical Processes**, v. 4, n. 1, p. 1–8, 2016.

MASCHINEN, B. *et al.* Selecting models of evolution. **The Phylogenetic Handbook**. A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing. 2009.

MATA, H. *et al.* Molecular phylogeny and biogeography of the eastern Tapaculos (Aves: Rhinocryptidae: Scytalopus, Eleoscytalopus): Cryptic diversification in Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 53, n. 2, p. 450–462, 2009.

MAURÍCIO, G. N. *et al.* Hidden generic diversity in Neotropical birds: Molecular and anatomical data support a new genus for the “*Scytalopus*” *indigoticus* species-group (Aves: Rhinocryptidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, n. 1, p. 125–135, 2008.

MCHUGHEN, A.; WAGER, R. Popular misconceptions: Agricultural biotechnology. **New Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 724–728, 2010.

MENNA, P. *et al.* Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 315–332, 2006.

MOHKAM, M. *et al.* Identification of *Bacillus* Probiotics Isolated from Soil Rhizosphere Using 16S rRNA , recA , rpoB Gene Sequencing and RAPD-PCR. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 8, n. 1, p. 22–32, 2016.

NASCIMENTO, F. F.; REIS, M. DOS; YANG, Z. A biologist’s guide to Bayesian phylogenetic analysis. **Nature Ecology and Evolution**, v. 1, n. 10, p. 1446–1454, 2017.

NESI, C. N. Pragas e doenças do milho. Epagri. 2016.

NUNES, C. A. Biological control of postharvest diseases of fruit. **European Journal of Plant Pathology**, v. 133, n. 1, p. 181–196, 2012.

NUSS, E. T.; TANUMIHARDJO, S. A. Maize: A paramount staple crop in the context of global nutrition. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 4, p. 417–436, 2010.

O'HAGAN, D. Biosynthesis of Fatty Acid and Polyketide Metabolites. v. 992, n. 3, 1992.

OLIVEIRA. Endofíticos de *Piper glabratum* Kunth. n. 45, p. 3–9, 2015.

OROZCO-MOSQUEDA, M. DEL C. *et al.* Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. **Microbiological Research**, v. 208, n. November 2017, p. 25–31, 2018.

PAL, K. K. AND B. M. G. Biological control of plant pathogens. The Plant Health Instructor. doi: 10.1094. **The Plant Health Instructor**, p. 1–25, 2006.

PARASKEVOPOULOS, C. *et al.* Toward a *Wolbachia* multilocus sequence typing system: Discrimination of *Wolbachia* strains present in *Drosophila* species. **Current Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 388–395, 2006.

PARIKH, L.; ESKELSON, M. J.; ADESEMOYE, A. O. Relationship of in vitro and in planta screening: improving the selection process for biological control agents against *Fusarium* root rot in row crops. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 51, n. 3–4, p. 156–169, 2018.

PEČENKA, J. *et al.* Species-specific PCR primers for the detection of poorly distinguishable *Xanthomonas euvesicatoria*. **Crop Protection**, v. 127, n. March 2019, p. 1–5, 2020.

PIETERSE, M. J. *et al.* Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. 2014.

POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 7, p. 1253–1256, 2008.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. Selecting the Best-Fit Model of Nucleotide Substitution. **Systematic Biology**, v. 50, n. 4, p. 580–601, 2001.

RAAIJMAKERS, J. M. *et al.* Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: More than surfactants and antibiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 6, p. 1037–1062, 2010.

RABBEE, M. F. *et al.* *Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. **Molecules**, v. 24, n. 6, p. 1–13, 2019.

RAMBAUT, A. *et al.* Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. **Systematic Biology**, v. 67, n. 5, p. 901–904, 2018.

RANUM, P.; PEÑA-ROSAS, J. P.; GARCIA-CASAL, M. N. Global maize production, utilization, and consumption. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1312, n. 1, p. 105–112, 2014.

ROKAS, A.; CARROLL, S. B. More genes or more taxa? The relative contribution of gene number and taxon number to phylogenetic accuracy. **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, n. 5, p. 1337–1344, 2005.

ROMERA, F. J. *et al.* Induced systemic resistance (ISR) and Fe deficiency responses in dicot plants. **Frontier in Plant Sciences**. 2019.

RONQUIST, F. *et al.* Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, n. 3, p. 539–542, 2012.

RONQUIST, F.; DEANS, A. R. Bayesian Phylogenetics and Its Influence on Insect Systematics. **Annual Review of Entomology**, v. 55, n. 1, p. 189–206, 2010.

ROONEY, A. P. *et al.* Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. p. 2429–2436, 2009.

SANHUEZA, R, M, V.; MELO, I, S. Métodos usados no Biocontrole de Fitopatógenos. **Embrapa**. 2008.

SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **AMB Express**, v. 9, n. 1, 2019.

SANTOYO, G. *et al.* Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v. 183, p. 92–99, 2016.

SARAVANAKUMAR, K. *et al.* Effect of *Trichoderma harzianum* on maize rhizosphere microbiome and biocontrol of *Fusarium* Stalk rot. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

SARROCCO, S.; VANNACCI, G. Preharvest application of beneficial fungi as a strategy to prevent postharvest mycotoxin contamination: A review. **Crop Protection**, v. 110, n. November, p. 160–170, 2018.

SAVARY, S. *et al.* The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature Ecology and Evolution**, v. 3, n. 3, p. 430–439, 2019.

SERNA-SALDIVAR, S. O.; CARRILLO, E. P. Food uses of whole corn and dry-milled fractions. 3. ed. **Elsevier Inc.**, 2018.

SEZER, A. D.; AKBUĞA, J. Release characteristics of chitosan treated alginate beads: I. Sustained release of a macromolecular drug from chitosan treated alginate beads. **Journal of Microencapsulation**, v. 16, n. 2, p. 195–203, 1999.

SHIOMI, H. F. Seleção de bactérias endofíticas com ação antagônica a fitopatógenos. p. 535–538, 2008.

SPADARO, D.; GULLINO, M. L. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, n. 2, p. 185–194, 2004.

SPOEL, S. H.; DONG, X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 2, p. 89–100, 2012.

STEPHENS, J. H. G.; RASK, H. M. Inoculant production and formulation. **Field Crops Research**, v. 65, n. 2–3, p. 249–258, 2000.

STONE, J. K.; BACON, C. W.; WHITE, J. F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. **Microbial Endophytes**, v. 10, n. January 2000, p. 3–29, 2000.

SZILAGYI-ZECCHIN, V. J. *et al.* Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2014.

TORRES, M. J. *et al.* Biological activity of the lipopeptide-producing *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBacCA1 on common bean *Phaseolus vulgaris* L. pathogens. **Biological Control**, v. 105, p. 93–99, 2017.

USDA. United States Department of Agriculture. <https://www.usda.gov/>. 2019.

WANG, S. *et al.* *Bacillus velezensis* BM21, a potential and efficient biocontrol agent in control of corn stalk rot caused by *Fusarium graminearum*. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 30, n. 1, 2020.

WARREN, D. L. *et al.* RWTY (R We There Yet): An R package for examining convergence of Bayesian phylogenetic analyses. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 4, p. 1016–1020, 2017.

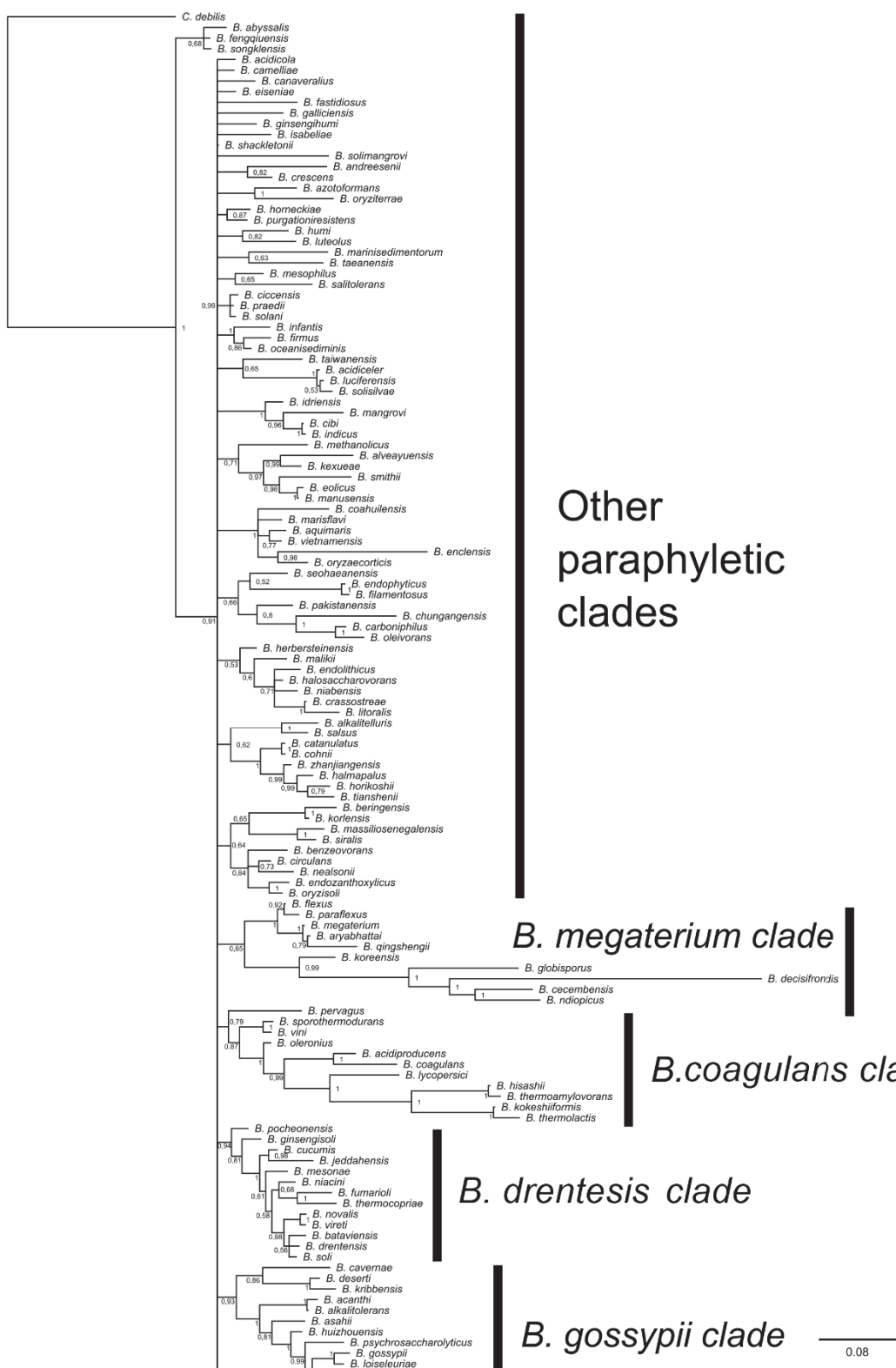
WEISBURG, W. G. *et al.* 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. v. 173, n. 2, p. 697–703, 1991.

XU, T.; ZHU, T.; LI, S. B-1,3-1,4-Glucanase Gene From *Bacillus Velezensis* Zj20 Exerts Antifungal Effect on Plant Pathogenic Fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 2, p. 1–9, 2016.

YANG, F. *et al.* An endophytic strain of the genus *Bacillus* isolated from the seeds of maize (*Zea mays* L.) has antagonistic activity against maize pathogenic strains. **Elsevier Ltd**, v. 142, 2020.

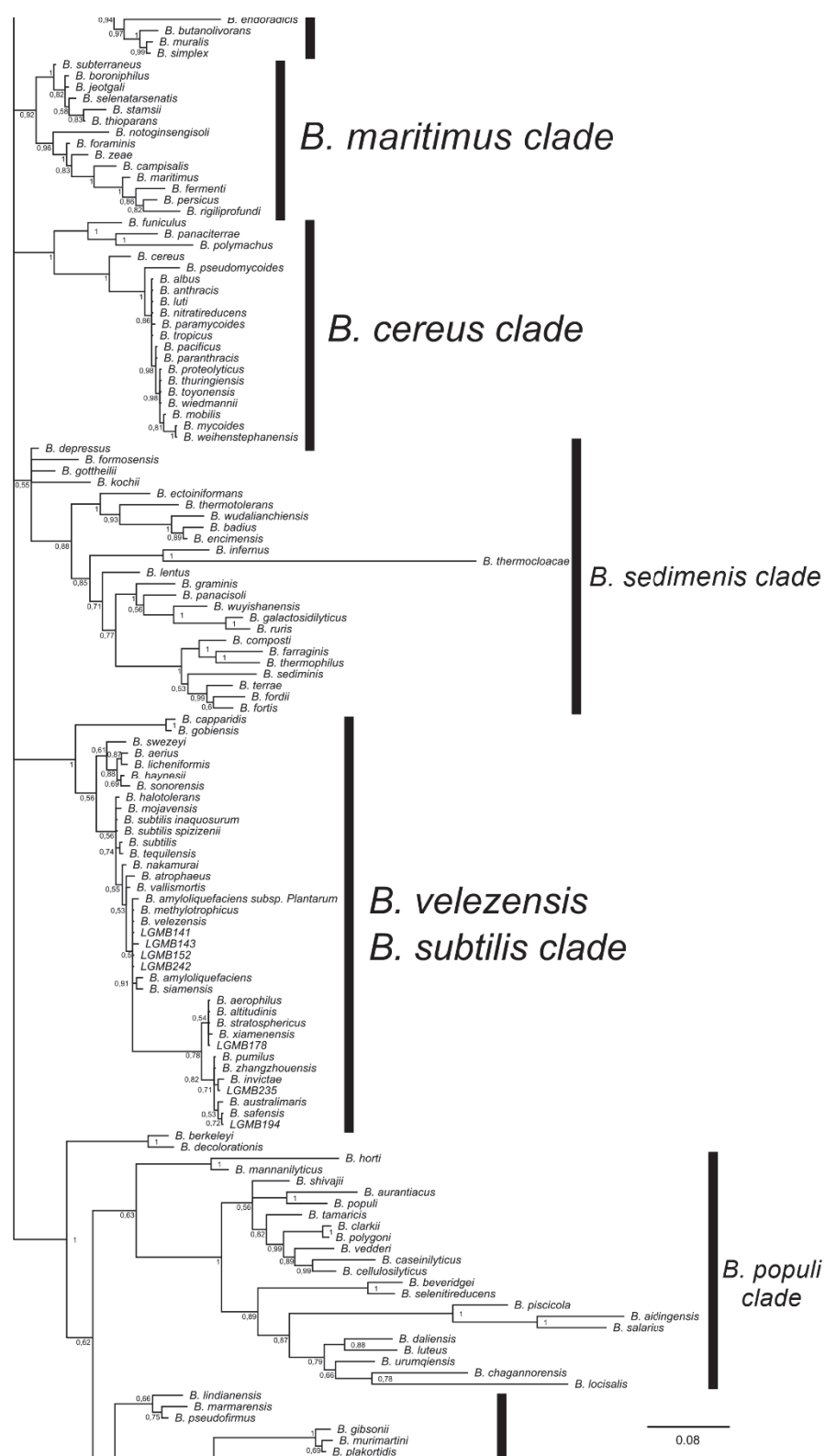
ZHU, Y. *et al.* Proposal to create subspecies of *Rickettsia conorii* based on multi-locus sequence typing and an emended description of *Rickettsia conorii*. **BMC Microbiology**, v. 5, p. 1–11, 2005.

6 SUPPLEMENTARY MATERIAL



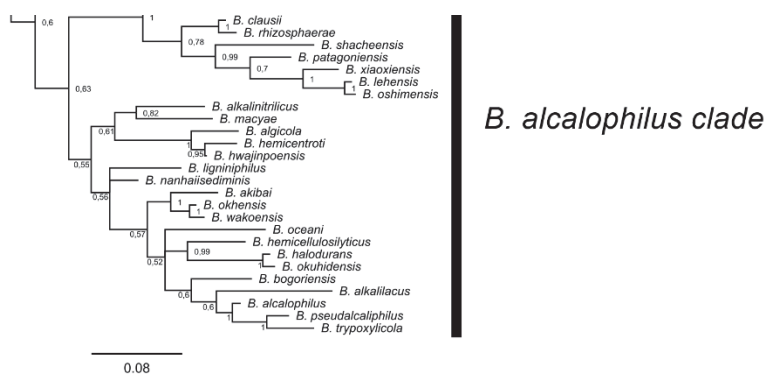
Continue...

Continuation.



Continue...

Continuation.



SUPPLEMENTARY FIGURE 1. Bayesian inference tree based on the 16S rRNA gene. The species *Caldibacillus debilis* was used as outgroup. Values on the node indicate posterior probabilities. Scale bar indicates substitutions per nucleotide position.